

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 8 月 25 日 (25.08.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/078086 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/68
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/002331
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 16 日 (16.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-040381 2004 年 2 月 17 日 (17.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): サッポロ
ビール株式会社 (SAPPORO BREWERIES LIMITED)
[JP/JP]; 〒1508522 東京都渋谷区恵比寿四丁目 2 〇 番
1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中北 保一
(NAKAKITA, Yasukazu) [JP/JP]; 〒4250013 静岡県焼
津市岡当日 1 〇 番地サッポロビール株式会社 価値
創造フロンティア研究所内 Shizuoka (JP). 土屋 陽一
(TSUCHIYA, Youichi) [JP/JP]; 〒4250013 静岡県焼津
市岡当日 1 〇 番地サッポロビール株式会社 価値創
造フロンティア研究所内 Shizuoka (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.);
〒1040061 東京都中央区銀座一丁目 1 〇 番 6 号銀座
ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING AND IDENTIFYING LACTIC ACID BACTERIUM

(54) 発明の名称: 乳酸菌の検出・識別方法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of detecting a lactic acid bacterium which might cause clouding of beer; and a method of simultaneously detecting and identifying various lactic acid bacteria including the above-described one.

(57) 要約: ビールを混濁させ得る乳酸菌を検出する方法、及び当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供する。



WO 2005/078086 A1

明 細 書

乳酸菌の検出・識別方法

技術分野

[0001] 本発明は、乳酸菌の検出・識別方法に関する。

背景技術

[0002] 近年のビールの生ビール化への流れは、ビール鮮度という新たな価値観をもたらした。こうした背景から、ビール製造会社にとっては、ビールの製造から出荷までの時間を劇的に短縮するために、ビールを混濁させる菌(ビール混濁菌)の汚染を迅速かつ正確に判定する必要が高まっている。

[0003] 汚染事例が最も多いビール混濁菌として乳酸菌が挙げられる。乳酸菌の迅速な検出方法として、PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)、FISH法(蛍光in situハイブリッド形成法)を利用した各種検出法が既に知られている(例えば、特許文献1〜5参照)。

[0004] 特許文献1:特開平5-15400号公報

特許文献2:特開平6-141899号公報

特許文献3:特開平7-289295号公報

特許文献4:特開平10-210980号公報

特許文献5:特開平14-034578号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、本発明者らは、ビールを混濁させる新規な乳酸菌を発見し、上記従来技術の方法では当該菌を検出できない可能性があることを見出した。

[0006] したがって、本発明の目的は、従来の方法では検出できなかったビールを混濁させる乳酸菌を検出する方法を提供することにある。本発明の目的は、さらに、当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 上記目的を達成するために、本発明は、配列番号1〜5に示す塩基配列の全部又

は一部からなるポリヌクレオチドを提供する。

- [0008] 本発明は、また、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) の検出方法を提供する。
- [0009] 本発明は、また、配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) の検出方法を提供する。
- [0010] 本発明は、また、配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) 検出用プライマーセット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の検出方法を提供する。
- [0011] 本発明は、さらに、配列番号30及び11〜14に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなる乳酸菌の検出・識別用プライマーセット、配列番号15〜19に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなる乳酸菌の検出・識別用プローブセット、当該プライマーセット及び当該プローブセットを含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別用キット、並びに、当該プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片と当該プローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定する工程を含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別方法を提供する。
- [0012] 本発明者らは、既知の方法では検出できないビールを混濁させ得る乳酸菌である *L. hexosus* 及び *L. pseudocollinoides* を分離することに成功し、*L. hexosus* SBC8050株

(未承認名)及び*L. pseudocollinoides* SBC8057株(未承認名)の16S リボソーマルRNA遺伝子(16S rRNA遺伝子)の塩基配列が、それぞれ、配列番号1及び3に示す塩基配列であることを明らかにし、*gyrB*遺伝子の塩基配列の一部が、それぞれ、配列番号2及び4に示す塩基配列であることを明らかにした。また、ビール中で増殖し得る乳酸菌であるペディオコッカス・ダムノサス(*Pediococcus damnosus*)の*gyrB*遺伝子の塩基配列の一部が、配列番号5に示す塩基配列であることを明らかにした。*L. hexosus* SBC8050株及び*L. pseudocollinoides* SBC8057株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(郵便番号305-8566))に2003年10月21日に寄託されており、寄託番号は、それぞれ、FERM BP-08529及びFERM BP-08530である。

[0013] *L. hexosus*検出用プライマーセット、*L. pseudocollinoides*検出用プライマーセット又は*P. damnosus*検出用プライマーセットを用いることにより、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*又は*P. damnosus*の*gyrB*遺伝子の特異的に増幅することができるため、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*又は*P. damnosus*を検出することが可能となる。

[0014] また、乳酸菌の検出・識別用プライマーセットを用いることにより、様々な乳酸菌の16S rRNA遺伝子又は*gyrB*遺伝子を増幅することができる。そして、得られた核酸断片と乳酸菌の検出・識別用プローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定することにより、核酸断片の由来している混濁菌の種類の違いによって融解温度が異なるため、融解温度の違いにより乳酸菌の検出及び識別することが可能となる。

発明の効果

[0015] 従来の方法では検出できなかったビールを混濁させ得る乳酸菌を検出する方法及び当該菌を含めた様々な乳酸菌を同時に検出・識別する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]640nmにおける(a)*L. brevis* SBC8003株及び(b)*L. hexosus* SBC8050株の融解曲線である。

[図2]710nmにおける(c)*L. collinoides* JCM1123株、(d)*P. damnosus* JCM5886株

及び(e) *L. pseudocollinoides* SBC8057株の融解曲線である。

発明を実施するための最良の形態

[0017] 以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

[0018] <ポリヌクレオチド>

まず、本発明のポリヌクレオチドについて説明する。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1〜5に示す塩基配列の全部又は一部からなることを特徴とするが、配列番号1〜5に示す塩基配列の相補配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチドをも含む。ここで、配列番号1及び3は、それぞれ、*L. hexosus*及び*L. pseudocollinoides*の16S rRNA遺伝子の塩基配列を表わす。また、配列番号2、4及び5は、それぞれ、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*及び*P. damnosus*のgyrB遺伝子の塩基配列の一部を表わす。本発明のポリヌクレオチドは、以下に述べるように、上記乳酸菌を検出する上で有用であり、乳酸菌の検出用プライマー、プライマーにより増幅された核酸断片、検出用プローブ等として使用可能である。また、本発明のポリヌクレオチドは蛍光物質等により化学修飾されていてもよい。

[0019] 本発明のポリヌクレオチドが乳酸菌の検出用プライマー又は検出用プローブとして使用される場合には、ヌクレオチドの長さが10〜30(好ましくは15〜25)であるオリゴヌクレオチドであることが望ましい。プライマーの設計は、当業者であれば容易に行うことができ、必要があれば、プライマー設計支援ソフトウェアを利用して設計することも可能である。

[0020] なお、本発明において「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」とは、DNA、RNA及びPNA(ペプチド核酸)を含む意味で用いられる。また、本発明のポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドは、例えば、ホスホロアミダイト法等の公知の方法により合成することが可能である。

[0021] <*L. hexosus*の検出>

次に、本発明の*L. hexosus*検出用プライマーセット及びそれを用いた*L. hexosus*の検出方法について説明する。本発明の*L. hexosus*検出用プライマーセットは、配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドは*L. hexosus*の

gyrB遺伝子に特異的な塩基配列を有していることから、*L. hexosus*のgyrB遺伝子の特異的に増幅することができるため、*L. hexosus*を特異的に検出することが可能である。

[0022] 本発明の検出方法により*L. hexosus*の検出を行うには、まず、試料(例えば、ビールや発泡酒などの麦芽飲料)から核酸を抽出する。核酸の抽出は、当技術分野で公知の方法を使用することによりでき、具体的には例えば、フェノール抽出及びエタノール沈殿を行う方法、ガラスビーズを用いる方法などによりDNAを抽出することができ、AGPC法やグアニジン・塩化セシウム超遠心法などによりRNAを抽出することができる。

[0023] 次に、得られた核酸を鋳型とし、前記プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する。増幅方法として、当技術分野で公知の増幅方法を用いることができるが、特に、PCR法又はRT-PCR法が好ましい。PCR法では、抽出されたDNAを鋳型として、DNAポリメラーゼにより、gyrB遺伝子のうちプライマーセットに挟まれた部分の塩基配列からなる核酸断片が増幅される。PCR法では、変性、アニーリング、相補鎖合成からなるサイクルを繰り返すことにより核酸断片(二本鎖DNA)が、各工程の温度や時間、サイクル数等のPCRの最適条件は、当業者であれば容易に決定することができる。RT-PCR法では、抽出されたRNAを鋳型として、逆転写酵素によりcDNAを合成し、得られたcDNAを鋳型としてPCR法を行うものである。

[0024] 次に、増幅された核酸断片を検出する。すなわち、増幅された核酸断片が*L. hexosus*に特異的なものか否かを判定する。検出は、当技術分野で公知の方法により行うことができ、例えば、*L. hexosus*に特異的にハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションにより行うことが可能である。

[0025] <*L. pseudocollinoides*の検出>

次に、本発明の*L. pseudocollinoides*検出用プライマーセット及びそれを用いた*L. pseudocollinoides*の検出方法について説明する。本発明の*L. pseudocollinoides*検出用プライマーセットは、配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドは*L. pseudocollinoides*のgyrB遺伝子に特異的な塩基配列を有している

ことから、*L. pseudocollinoides*の*gyrB*遺伝子の特異的に増幅することができるため、*L. pseudocollinoides*を特異的に検出することが可能である。

[0026] *L. pseudocollinoides*の検出方法は、上記の*L. hexosus*の検出方法と同様に行うことが可能である。

[0027] <*P. damnosus*の検出>

次に、本発明の*P. damnosus*検出用プライマーセット及びそれを用いた*P. damnosus*の検出方法について説明する。本発明の*P. damnosus*検出用プライマーセットは、配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなることを特徴とし、両オリゴヌクレオチドはの*gyrB*遺伝子に特異的な塩基配列を有していることから、*P. damnosus*の*gyrB*遺伝子の特異的に増幅することができるため、*P. damnosus*を特異的に検出することが可能である。

[0028] *P. damnosus*の検出方法は、上記の*L. hexosus*の検出方法と同様に行うことが可能である。

[0029] <乳酸菌の検出・識別>

最後に、本発明の乳酸菌の検出・識別用プライマーセット、プローブセット及びキット並びにそれらを用いた乳酸菌の検出・識別方法について説明する。

[0030] 本発明の乳酸菌の検出・識別用プライマーセットは、配列番号30及び11～14に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする。なお、配列番号30に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマーである。本発明のプライマーセットを用いることにより、様々な乳酸菌の核酸断片を増幅することが可能である。

[0031] 本発明の乳酸菌の検出・識別用プローブセットは、配列番号15～18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなることを特徴とする。本プローブセットは、以下に述べるように、様々な乳酸菌の核酸断片を検出するのに用いることができ、乳酸菌を検出・識別することが可能である。

[0032] 本発明の乳酸菌の検出・識別用キットは、前記プライマーセットと前記プローブセットを含むことを特徴とする。本キットは、さらに、反応バッファー、dNTP混合物、酵素などを含んでいてもよく、DNA抽出試薬などを含んでいてもよい。

- [0033] 本発明の検出・識別方法により乳酸菌を検出・識別するには、まず、試料(例えば、ビールや発泡酒などの麦芽飲料)から核酸を抽出する。核酸の抽出は、前述の方法と同様の方法により行うことができる。
- [0034] 次に、得られた核酸を鋳型とし、前記プライマーセットを用いて核酸断片を増幅する。増幅は、前述の方法と同様の方法により行うことができ、PCR法又はRT-PCR法が好ましい。
- [0035] 次に、得られた核酸断片と前記プローブセットとのハイブリッドを形成させ、ハイブリッドの融解温度を測定する。融解温度の測定原理の概要は次のとおりである。配列番号15〜16及び17〜18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、それぞれ、5'末端が蛍光物質であるLC Led640及びLC Led705で標識されている(以下、それぞれ「Led640プローブ」及び「Led705プローブ」という。)。一方、配列番号19に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、3'末端がFITCで標識されている(以下、「FITCプローブ」という。)。そして、各プローブは、FITCプローブの3'末端とLed640プローブ及びLed705プローブの5'末端とが近接して乳酸菌の核酸断片とハイブリダイズするように設計されている。核酸断片にFITCプローブとLed640プローブ(又はLed705プローブ)とがともにハイブリダイズしている状態で、ハイブリッドにFITCの励起波長の光を照射すると、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)が生じ、Led640(又はLed705)の蛍光波長の光が観察される。この状態から温度を上昇させていくと、FITCプローブ及び／又はLed640プローブ(又はLed705プローブ)が融解して核酸断片から剥がれていき、それに従ってFRETが生じなくなりLed640(又はLed705)の蛍光強度が減少していく。そして、各温度における蛍光強度を測定し、横軸に温度をとり、縦軸に蛍光強度(変化率も含む)をとれば、融解曲線が得られる。このようにして得られた融解曲線を解析することにより、ハイブリッドの融解温度を求めることができる。
- [0036] FITCプローブ及び／又はLed640プローブ(又はLed705プローブ)は、核酸断片とのミスマッチの程度が乳酸菌の種類によって差が生じるように設定してある。したがって、乳酸菌の種類によって、それぞれのプローブの示す融解曲線及び融解温度が異なるため、その違いに基づいて乳酸菌の種類を判別することが可能である。具

体的には、*L. brevis* SBC8003株は約60℃、*L. hexosus* SBC8050株は約56℃及び約63℃、*P. damnosus* JCM5886株は約62℃、*L. pseudocollinoides* SBC8057株は約64℃、*L. collinoides* JCM1123株は約58℃の融解温度を示す。試料の融解温度とこれらの融解温度を比較することにより、試料中に含まれている乳酸菌の検出・識別を行うことができる。

- [0037] なお、本発明のプローブセットは、核酸断片を増幅する反応溶液に混ぜておくことができるため、核酸断片の増幅反応が終了後ただちに融解温度を測定することができる。したがって、本発明の乳酸菌の検出・識別方法は、1つのチューブやキャピラリー内で核酸断片を増幅する工程と融解温度を測定する工程を連続して行えるという利点がある。

実施例

- [0038] 以下、実施例を挙げて本発明について更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

- [0039] (実施例1) *L. hexosus*及び*L. pseudocollinides*の植菌によるビールの混濁

L. hexosus SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株を、それぞれ、MRS寒天培地(ベクトン・ディッキンソン社)で増殖させた。1白金耳量の各菌株を、それぞれ、瓶入りの全麦芽ビール(pH4.5、苦味価30、アルコール5%、容量350mL)に植菌し、ビール瓶に打栓をし、30℃にて約1ヶ月間培養を行ったところ、ビールが混濁した。

- [0040] 表1は培養1ヶ月後の混濁ビール中の有機酸の濃度(正常ビールに対する比率(%))を示したものである。*L. hexosus* SBC8050株を植菌した混濁ビールは、正常ビールに比べ、乳酸の濃度が約3倍になった。このことから、*L. hexosus*はホモ発酵タイプの乳酸菌であることが分かった。一方、*L. pseudocollinides* SBC8057株を植菌した混濁ビールは、正常ビールに比べ、乳酸の濃度が約4倍になり、酢酸の濃度が約2倍になった。このことから、*L. pseudocollinides*はヘテロ発酵タイプの乳酸菌であることが分かった。

- [0041] [表1]

有機酸	<i>L. hexosus</i> SBC8050	<i>L. pseudocollinides</i> SBC8057
リンゴ酸	1 7	9 9
乳酸	3 2 6	4 1 0
酢酸	1 1 5	1 9 1
コハク酸	9 5	9 4

- [0042] (実施例2) 16S rRNA遺伝子及びgyrB遺伝子のシーケンス
(ゲノムDNAの調製)

L. hexosus SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株を、それぞれ、MRS寒天培地に植菌し、30℃にて、7～14日間、嫌気培養を行った。嫌気培養は、タバリエスペック社製の嫌気培養装置を用い、 $N_2:H_2:CO_2=90:5:5$ という条件で行った。嫌気培養した菌株の菌体から、それぞれ、DNA抽出液PrepMan Ultra (アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いて、DNAの抽出を行った。

- [0043] (16S rRNA遺伝子の増幅・解析)

上記方法により調製したDNA抽出液について、MicroSeq Full Gene 16S rDNAキット(アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いて、各菌株の16S rRNA遺伝子のシーケンスをそれぞれ行った。

- [0044] シーケンスの結果得られた*L. hexosus* SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株の16S rRNA遺伝子配列を、それぞれ、配列番号1及び3に示す。本遺伝子配列は、現在までに報告されているビールを混濁させる乳酸菌の遺伝子配列とは、明らかに異なっていた。さらに、GenBank等のデータベース検索を行ったが、登録されている何れの遺伝子配列とも一致しなかった。したがって、*L. hexosus*及び*L. pseudocollinides*はビールを混濁させる新規な乳酸菌であることが明らかとなった。

- [0045] (gyrB遺伝子の増幅・解析)

反応液TaKaRa Ex Taq (寶酒造社)に、上記DNA抽出液、及びプライマーセット(*L. hexosus*及び*L. pseudocollinoides*については、配列番号26に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(GYPF:5'-ggwtayaargtwtcwggtggt-3')及び配列番号27に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(GYPR:5'-tcatgygtwcaccttcat-3')のセットを、*Pediococcus damnosus*については、配列番号28に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(GP1-F:5'-attatgntgcnnngncaaatncaa-3')及び配列番号29に示す塩

基配列からなるオリゴヌクレオチド(GP1-R:5'-accaccwgawacyttrtawcc-3')のセットを使用)を加え、GeneAmp PCR System 9700(アプライド・バイオシステムズジャパン社)を用いてPCRを行った。1サイクルを95℃で30秒間(DNA変性)、55℃で30秒間(アニーリング)、72℃で45秒間(DNA伸長反応)とし、これを35サイクル行った。

[0046] PCR終了後、5 μ Lの反応溶液をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、PCR産物を検出した。電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液で10分間染色した後、紫外線を照射して観察することにより、DNAのバンドを確認した。

[0047] *gyrB*遺伝子の塩基配列の決定は、GYPF及びGYPRのプライマーセット又はGP1-F及びGP1-Rのプライマーセットを用いて、ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit及びジェネティックアナライザーABI PRISM310(アプライド・バイオシステムズジャパン社)で行った。

[0048] シークエンスの結果得られた*L. hexosus* SBC8050株及び*L. pseudocollinides* SBC8057株の*gyrB*遺伝子配列を、それぞれ、配列番号2及び4に示す。また、*Pediococcus damnosus* SBC8023株の*gyrB*遺伝子配列を、配列番号5に示す。本遺伝子配列についてGenBank等のデータベース検索を行ったが、登録されている何れの遺伝子配列とも一致しなかった。

[0049] (実施例3) *gyrB*遺伝子を利用した*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*及び*P. damnosus*の検出及び識別

実施例2と同様の方法により、ビールを混濁させ得る様々な菌株からDNAを抽出し、得られたDNA抽出液について、以下のプライマーセットを用いてPCRを行った。*L. hexosus*用プライマーセットとして、配列番号6及び7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、*L. pseudocollinoides*用プライマーセットとして、配列番号7及び8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット、及び*P. damnosus*用プライマーセットとして、配列番号9及び10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなるプライマーセット。なお、PCRの反応条件は実施例2と同様であり、また、増幅産物の確認も実施例2と同様の方法で行った。

[0050] 表2は、各プライマーセットにより、各種菌株から増幅産物が得られた否かをまとめたものである。

[0051] [表2]

供試菌株	<i>L. hexosus</i> 用 プライマーセット	<i>L. pseudocollinoides</i> 用プライマーセット	<i>P. damnosus</i> 用 プライマーセット
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8050	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8051	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8817	+	—	—
<i>Lactobacillus hexosus</i> SBC8818	+	—	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8057	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8058	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8063	—	+	—
<i>Lactobacillus pseudocollinoides</i> SBC8064	—	+	—
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>toruens</i> JCM1166	—	—	—
<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> JCM1164	—	—	—
<i>Lactobacillus collinoides</i> JCM1123	—	—	—
<i>Lactobacillus lindneri</i> VTT-E-89362	—	—	—
<i>Lactobacillus</i> sp. SBC8021	—	—	—
<i>Lactobacillus</i> sp. SBC8019	—	—	—
<i>Lactobacillus brevis</i> SBC8003	—	—	—
<i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1142	—	—	—
<i>Lactobacillus malefementans</i> JCM1167	—	—	—
<i>Lactobacillus buchneri</i> JCM1115	—	—	—
<i>Lactobacillus paracasei</i> JCM1171	—	—	—
<i>Pediococcus damnosus</i> JCM5886	—	—	+
<i>Pediococcus damnosus</i> SBC8023	—	—	+
<i>Pediococcus damnosus</i> SBC8024	—	—	+
<i>Pediococcus acidilactici</i> ID152-3	—	—	—

+ : 増幅産物あり — : 増幅産物なし

JCM: Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japan

VTT: Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus, Finland

SBC, ID: サッポロビール分離株

[0052] 表2に示した結果から明らかなように、*L. hexosus*用プライマーセットを用いた場合、*L. hexosus*に属する菌株のみに増幅産物(322bp)が確認され、*L. pseudocollinoides*用プライマーセットを用いた場合、*L. pseudocollinoides*に属する菌株のみに増幅産物

(362bp)が確認され、*P. damnosus*用プライマーセットを用いた場合、*P. damnosus*に属する菌株のみに増幅産物(194bp)が確認された。このことから、これらのプライマーセットを用いることにより、*L. hexosus*、*L. pseudocollinoides*及び*P. damnosus*を特異的に検出できることが明らかとなった。なお、使用した一部の菌株(サッポロビール分離株)については、実施例2と同様の方法により、16S rRNA遺伝子配列からの菌種決定を行った。

[0053] (実施例4) リアルタイムPCRを用いた乳酸菌の検出及び識別

実施例2と同様の方法により調製した様々な菌株からDNA抽出液について、以下のプライマー及びプローブを用いて、表3に示した反応試薬の組成でPCRを行った。プライマーとして、配列番号30に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(16S rRNA遺伝子のユニバーサルプライマー、5'-TGGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3')及び配列番号11〜14に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを使用した。プローブとして、配列番号15及び16に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をリン酸化し、5'末端をLC Red640でラベルしてある)、配列番号17及び18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をリン酸化し、5'末端をLC Red705でラベルしてある)及び配列番号19に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチド(3'末端をFITCでラベルしてある)を使用した。

[0054] [表3]

試薬	容量
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes*	2. 0 μ L
プライマー (10 μ M)	各 1. 0 μ L
プローブ (10 μ M)	各 0. 4 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	1. 6 μ L
滅菌水	7. 5 μ L
DNA抽出液	0. 5 μ L
合計	20. 0 μ L

* : ロシュ・ダイアグノスティックス社製

[0055] 反応装置にLightCyclerクイックシステム330(ロシュ・ダイアグノスティックス社)を用い、95℃で10分間処理した後、1サイクルを95℃で15秒間、50℃で5秒間、72℃で20秒間とし、それを40サイクル繰り返すことによりPCRを行った。

- [0056] PCR終了後引き続いて95℃まで温度を上昇させた後、直ちに40℃まで冷却し、同温度を15秒間保持した後、20℃／秒の割合で95℃まで温度を上昇させた。この加熱の間、640nm及び710nmの蛍光強度を0.2℃毎に測定し、その値の一次微分の負の値($-dF/dT$)をプロットして生じるピークにより融解温度を決定した。
- [0057] 図1は及び図2は、蛍光強度の変化率($-dF/dT$)と温度(℃)との関係を表わす融解曲線である。図1は、640nmにおける(a) *L. brevis* SBC8003株及び(b) *L. hexosus* SBC8050株の融解曲線を表わし、図2は、710nmにおける(c) *L. collinoides* JCM1123株、(d) *P. damnosus* JCM5886株及び(e) *L. pseudocollinoides* SBC8057株の融解曲線を表わす。
- [0058] 図1及び図2に示した結果から明らかなように、*L. brevis* SBC8003株は640nmで約60℃、*L. hexosus* SBC8050株は640nmで約56℃及び約63℃、*P. damnosus* JCM5886株は710nmで約62℃、*L. pseudocollinoides* SBC8057株は710nmで約64℃の融解温度を示すピークが観察された。また、ビールを混濁させ得る乳酸菌ではない*L. collinoides* JCM1123株でも710nmで約58℃の融解温度を示すピークが観察されたが、前記のビールを混濁させ得る乳酸菌のピークとは重ならないため、菌の識別が可能であった。なお、本実施例において用いた菌株は表2に示した菌株と同一であるが、上記以外の菌株は、融解曲線においてピークを示さなかった。
- [0059] このことから、上記プライマー及びプローブを用いることにより、ビールを混濁させ得るすべての乳酸菌を一種類の反応液で検出・識別することができることが明らかとなった。
- [0060] (実施例5) リアルタイムPCRを用いた乳酸菌の個別の検出及び識別
- 実施例4で検出・識別された乳酸菌について、確定試験用の条件を検討した。その結果、表4に示した目的に応じたプライマー及びプローブを用いて実施例4と同様の方法を行うことにより、確定試験を行うことが可能であった。
- [0061] [表4]

対象菌	プライマー	プローブ	融解温度
<i>L. hexosus</i>	配列番号 6, 8, GYPR	配列番号 20*, 21**	約 57 °C
<i>L. pseudocollinoides</i>	配列番号 6, 8, GYPR	配列番号 20*, 21**	約 49 °C
<i>L. brevis</i>	配列番号 25, GYPR	配列番号 22*, 23***	約 62 °C
<i>L. brevis</i>	配列番号 11, 24	配列番号 15***, 19*	約 60 °C

* : 3' 末端を F I T C でラベルしてある

** : 3' 末端をリン酸化し、5' 末端を L C R e d 7 0 5 でラベルしてある

*** : 3' 末端をリン酸化し、5' 末端を L C R e d 6 4 0 でラベルしてある

産業上の利用可能性

[0062] 本発明は、様々なビール混濁菌を同時に検出・識別できるため、ビールの品質管理に利用することができる。

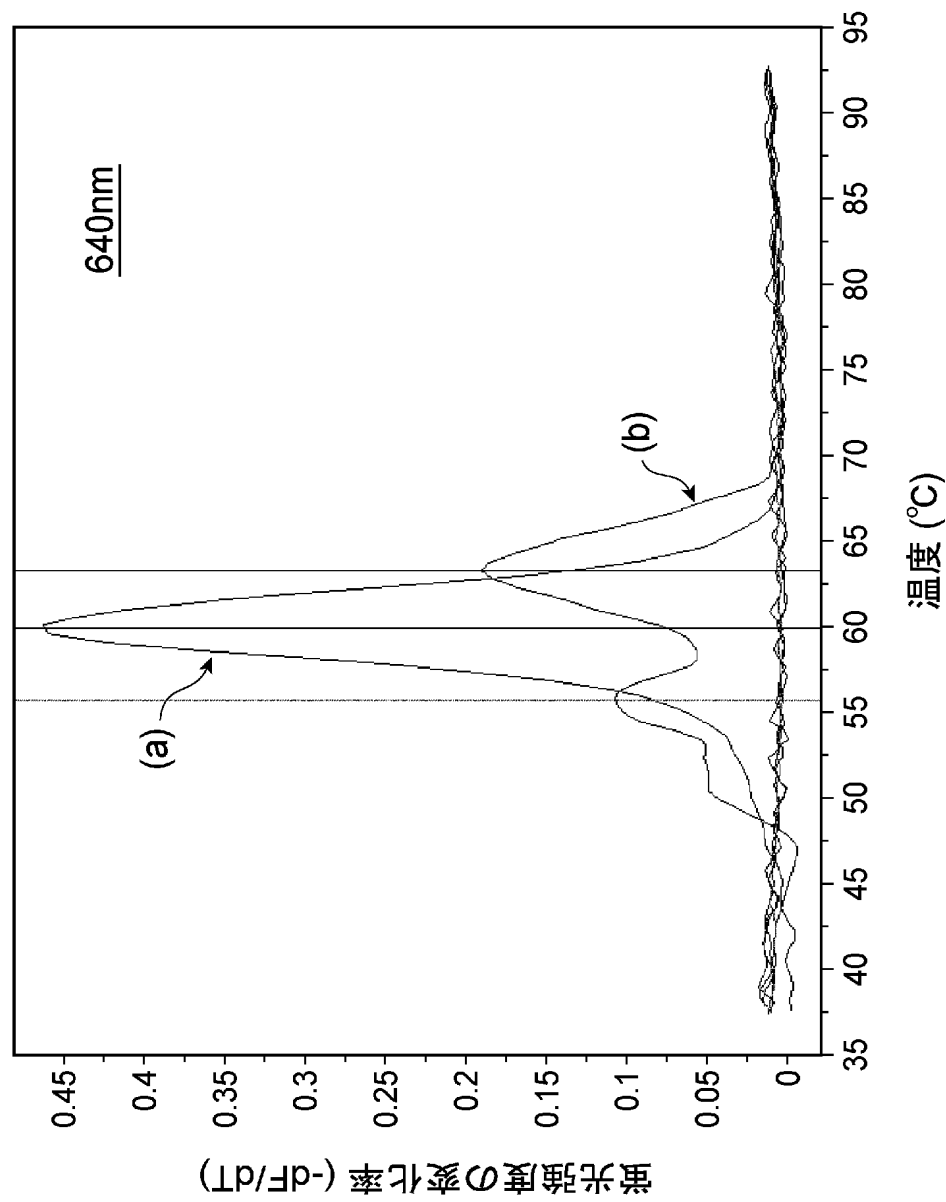
請求の範囲

- [1] 配列番号1〜5に示す塩基配列の全部又は一部からなるポリヌクレオチド。
- [2] 配列番号6に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) 検出用プライマーセット。
- [3] 配列番号7に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ラクトバチルス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) 検出用プライマーセット。
- [4] 配列番号9に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと配列番号10に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドとからなる、ペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) 検出用プライマーセット。
- [5] 配列番号30に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号11に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号12に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号13に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号14に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、からなる乳酸菌の検出・識別用プライマーセット。
- [6] 配列番号15に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号16に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号17に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号18に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、配列番号19に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、からなる乳酸菌の検出・識別用プローブセット。
- [7] 請求項5記載のプライマーセット及び請求項6記載のプローブセットを含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別用キット。
- [8] 請求項2記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチルス・ヘキソーサス (*Lactbacillus hexosus*) の検出方法。
- [9] 請求項3記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるラクトバチル

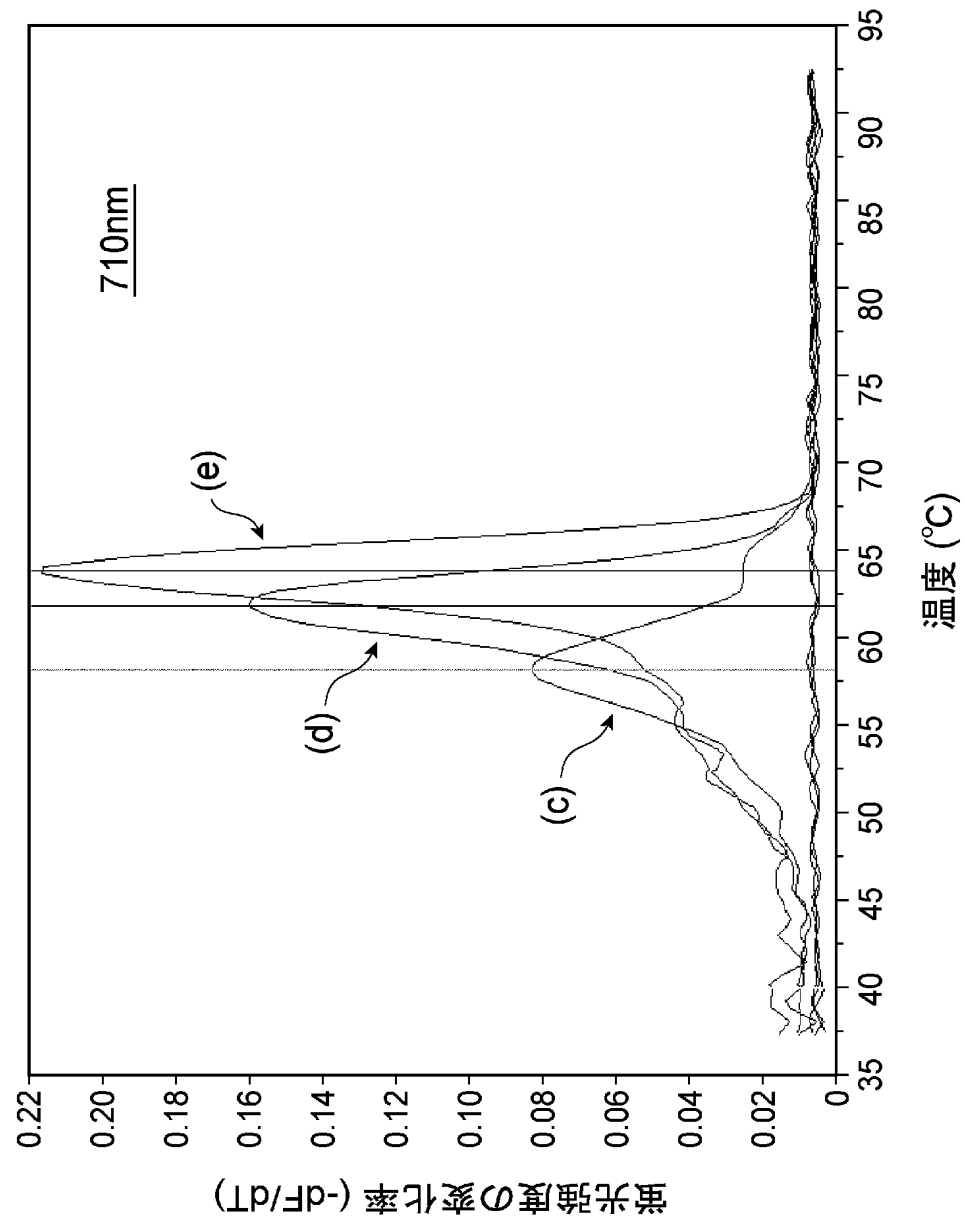
ス・シュードコリノイデス (*Lactbacillus pseudocollinoides*) の検出方法。

- [10] 請求項4記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片を検出する工程を含むことを特徴とする遺伝子増幅法によるペディオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の検出方法。
- [11] 請求項5記載のプライマーセットを用いて核酸断片を増幅する工程、及び、得られた核酸断片と請求項6記載のプローブセットとのハイブリッドの融解温度を測定する工程を含むことを特徴とする乳酸菌の検出・識別方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA/REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
$\frac{X}{A}$	Chenoll E. et al., Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. Syst.Appl.Microbiol., 2003, Vol.26, No.4, pages 546 to 556	$\frac{1}{2-11}$
$\frac{X}{A}$	JP 10-210980 A (Asahi Breweries, Ltd.), 11 August, 1998 (11.08.98), (Family: none)	$\frac{1}{2-11}$
$\frac{X}{A}$	JP 2003-250557 A (Sapporo Breweries Ltd.), 09 September, 2003 (09.09.03), (Family: none)	$\frac{1}{2-11}$



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April, 2005 (26.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Munoz R. et al., Ser-127-to-Leu substitution in the DNA gyrase B subunit of Streptococcus pneumoniae is implicated in novobiocin resistance. J.Bacteriol., 1995, Vol.177, No.14, pages 4166 to 4170	<u>1</u> 2-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)
<Referential document>

1. JP 10-210980 A
2. JP 2003-250557 A

Claim 1 presents: (1) a polynucleotide encoding 16S rRNA or gyrB originating in a beer-clouding lactic acid bacterium *Lactobacillus hexosus* and respectively comprising the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 and 2; (2) a polynucleotide encoding 16S rRNA or gyrB originating in a beer-clouding lactic acid bacterium *L. pseudocollinoides* and respectively comprising the base sequences represented by SEQ ID NOS:3 and 4; and (3) a polynucleotide encoding gyrB originating in a lactic acid bacterium *P. damnosus* being capable of growing in beer and comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:5. Namely, it appears that the inventions (1) to (3) as claimed in claim 1 have a common technical feature of being a polynucleotide originating in a lactic acid bacterium being capable of growing in beer (in the illustration of (1) and (2), being a polynucleotide originating in a beer-clouding bacterium belonging to the genus *Lactobacillus*).

However, the base sequence of 16S rRNA gene originating in a beer-clouding bacterium belonging to the genus *Lactobacillus* is described in document 1, while the base sequence of gyrB gene originating in a beer-clouding bacterium belonging to the genus *Lactobacillus* is described in document 2. Thus, the above-described inventions (1) to (3) as claimed in claim 1 are not regarded as having a common technical feature making a contribution over prior art and cannot be considered as being so linked as to from a single general inventive concept.

Now, it is examined, based on the detailed description of the invention and Sequence Listing, genes originating in which of the above-described three bacteria can be detected by the probes of the five SEQ ID NOS in the probe set for detecting and identifying lactic acid bacteria comprising oligonucleotides having the base sequences represented respectively by SEQ ID NOS:15 to 19 according to claim 6. First, the probes represented by SEQ ID NOS:15 and 19 each aims at detecting a lactic acid bacterium *L. brevis* having been publicly known before the priority date of the present application (see Table 4 in EXAMPLE 5, etc.). Although it is not stated in the description which lactic acid bacterium is detected by the probe represented by SEQ ID NO:18, the antisense sequence of this base sequence occurs on the base sequence of SEQ ID NO:3. Thus, it is recognized that this probe aims at detecting 16S rRNA originating in *L. pseudocollinoides*. Concerning the probes of SEQ ID NOS:16 and 17, these two base sequences (or the antisense sequences thereof) occur neither on the base sequences of the gyrB genes nor the base sequences of 16S rRNA genes originating in lactic acid bacteria represented by SEQ ID NOS:1 to 5 according to the invention. It is therefore considered that none of the above three lactic acid bacteria can be detected by using these probes.

Thus, it appears that, by using the probe set for detection and identification according to claim 6, *L. pseudocollinoides* and *L. brevis*, i.e., a lactic acid bacterium having been publicly known before the priority date of the present application can be detected but *L. hexosus* and *P. damnosus* cannot be detected.

(continued to next sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002331

Such being the case, it can be said that the present case has three invention groups in total, i.e., (1) the inventions relating to *L. hexosus* (i.e., the parts relating to SEQ ID NOS:1 and 2 in claim 1 and claims 2, 5, 7, 8 and 11); (2) the inventions relating to *L. pseudocollinoides* (i.e., the parts relating to SEQ ID NOS:3 and 4 in claim 1 and claims 3, 6 and 9); and (3) the inventions relating to *P. damnosus* (i.e., the part relating to SEQ ID NO:5 in claim 1 and claims 4 and 10).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/09, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12N15/00-15/90, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, CA/REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Chenoll E. et al., Identification of Carnobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc and Pediococcus by rDNA-based techniques. Syst. Appl. Microbiol., 2003, Vol.26, No.4, p.546-556	<u>1</u> 2-11
<u>X</u> A	J P 10-210980 A (アサヒビール株式会社) 1998.08.11 (ファミリーなし)	<u>1</u> 2-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.04.2005

国際調査報告の発送日

17.05.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三原 健治

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

3228

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	J P 2003-250557 A (サッポロビール株式会社) 2003.09.09 (ファミリーなし)	<u>1</u> 2-11
<u>X</u> A	Munoz R. et al., Ser-127-to-Leu substitution in the DNA gyrase B subunit of Streptococcus pneumoniae is implicated in novobiocin resistance. J. Bacteriol., 1995, Vol.177, No.14, p.4166-4170	<u>1</u> 2-11

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 III 欄の続き

《参考文献》

1. J P 10-210980 A
2. J P 2003-250557 A

請求の範囲 1 には、①配列番号 1、2 でそれぞれ示される塩基配列からなる、ビールを混濁させる乳酸菌 Lactobacillus hexosus 由来の 16S rRNA 又は gyrB をコードするポリヌクレオチド、②配列番号 3、4 でそれぞれ示される塩基配列からなる、ビールを混濁させる乳酸菌 L. pseudocollinoides 由来の 16S rRNA 又は gyrB をコードするポリヌクレオチド、及び、③配列番号 5 で示される塩基配列からなる、ビール中で増殖しうる乳酸菌 P. damnosus 由来の gyrB をコードするポリヌクレオチドが記載されている。したがって、請求の範囲 1 に記載された①-③の発明は、ビール中で増殖しうる乳酸菌由来のポリヌクレオチドという点（①及び②の発明では、ビールを混濁させる Lactobacillus 属由来のポリヌクレオチドという点）において共通の技術的特徴を有しているといえる。

しかしながら、参考文献 1 には、ビールを混濁させる Lactobacillus 属乳酸菌由来の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列が記載されており、参考文献 2 には、ビールを混濁させる Lactobacillus 属乳酸菌由来の gyrB 遺伝子の塩基配列が記載されているから、請求の範囲 1 における上記①-③の発明は、先行技術に対して貢献する技術的特徴を共有するものとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

ここで、請求の範囲 6 の、配列番号 15-19 にそれぞれ示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドからなる乳酸菌の検出・識別用プローブセットについて、これら 5 つの配列番号からなるプローブが、それぞれ上記 3 種のどの乳酸菌由来の遺伝子を検出するためのものであるかを、発明の詳細な説明と配列表に基づいて確認する。まず、配列番号 15 及び 19 で示されるプローブは、いずれも本願優先日前に公知の乳酸菌 L. brevis を検出するためのものである（実施例 5 の表 4 等参照）。また、配列番号 18 で表されるプローブがどの乳酸菌を検出するものであるかは、明細書中に特に記載されてはいないが、該塩基配列のアンチセンス配列が配列番号 3 の塩基配列上に存在することから、L. pseudocollinoides 由来の 16S rRNA を検出するためのものであると認められる。一方、配列番号 16 及び 17 からなるプローブについてみると、これら 2 つの塩基配列（又はそのアンチセンス配列）は、配列番号 1-5 で表される本願乳酸菌由来 gyrB 遺伝子又は 16S rRNA 遺伝子のいずれの塩基配列上にも存在しないことから、これらのプローブを用いても、上記 3 種のいずれの乳酸菌も検出することはできないと考えられる。

してみると、請求の範囲 6 の検出・識別用プローブセットは、L. pseudocollinoides 及び本願優先日前に公知の乳酸菌 L. brevis を検出・識別するものではあるが、L. hexosus と P. damnosus を検出することはできないものであるといえる。

よって、この出願には、①L. hexosus に関する発明（すなわち、請求の範囲 1 のうち配列番号 1、2 に関するもの、及び、請求の範囲 2、5、7、8、11）、②L. pseudocollinoides に関する発明（すなわち、請求の範囲 1 のうち配列番号 3、4 に関するもの、及び、請求の範囲 3、6、9）、及び、③P. damnosus に関する発明（すなわち、請求の範囲 1 のうち配列番号 5 に関するもの、及び、請求の範囲 4、10）の、計 3 の発明が包含されているといえる。